

СТРУКТУРНЫЙ ПОДХОД К МОДЕЛИРОВАНИЮ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ ДИНАМИКИ НЕСТАБИЛЬНЫХ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ,
СОДЕРЖАЩИХ МНОГОКОПИЙНЫЕ ПЛАЗМИДЫ

© 1999 г. В. В. Ганусов, А. В. Брильков, Н. С. Печуркин

Представлено академиком И.И. Гительзоном 09.12.98 г.

Поступило 16.12.98 г.

Известно, что большинство рекомбинантных штаммов бактерий, содержащих в составе плазмид клонированные гены с эффективной экспрессией, часто оказываются нестабильными [1–3]. Для исследования закономерностей популяционной динамики плазмидсодержащих клеток в различных условиях культивирования предложен ряд математических моделей [4], среди которых особое место занимает детерминированная модель Б. Левина и Ф. Стюарта (Levin B.R., Stewart F.M.), описывающая сегрегационную нестабильность плазмид в хемостате [5–7].

Многочисленные экспериментальные данные по культивированию плазмидсодержащих штаммов, полученные к настоящему времени, противоречат этой модели [2, 3, 8]. В большинстве случаев это связано с тем, что она относится только к случаю однокопийных плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов (в ней учитываются только два класса клеток – “плазмидные” и “бесплазмидные”), что в принципе не соответствует свойствам реальных рекомбинантных штаммов бактерий, которые в большинстве своем являются многокопийными (т.е. в популяции содержится N классов клеток с различным числом копий плазмиды) [1, 4, 8, 9]. Так, в экспериментах И. Джонса с соавт. [2] отмечена разная скорость замещения плазмидного штамма бесплазмидным при естественной элиминации после длительного культивирования в хемостате и после интродукции 0,1% изогенных бесплазмидных клеток в популяцию плазмидсодержащих бактерий в стационарном состоянии в хемостате [2]. Однако, согласно расчетам по математической модели Левина–Стюарта, для этого случая скорость замещения должна быть одинаковой (рис. 1). Можно предположить, что при длительном культивировании в хемостате уменьшается число копий плазмиды в клетках, соот-

ветственно и снижается селективное преимущество бесплазмидных вариантов. В настоящей работе предложен новый подход к моделированию популяционной динамики нестабильных рекомбинантных штаммов бактерий, содержащих многокопийные плазмиды, в селективных и неселективных условиях культивирования, с учетом различной эффективности экспрессии клонированных генов.

При описании нестабильности рекомбинантных штаммов микроорганизмов необходимо учитывать, по крайней мере, следующие экспериментальные факты [1, 4, 8–10]: 1) сегрегационную нестабильность плазмид, когда часть клеток популяции утрачивает плазмиды при делении; 2) нестабильность генетической структуры плазмид, при которой плазмиды сохраняются во всех клетках, но в измененном виде; 3) отличие кинетических характеристик роста популяции штамма, содержащего определенное количество копий плазмид, в сравнении с аналогичными у бесплазмидных или малокопийных вариантов, либо у вариантов, содержащих структурно измененные плазмиды.

Рассмотрим математическую модель нестабильности многокопийных плазмид в клетках бактерий при длительном культивировании в хемостате. Предположим, что в некоторый начальный момент времени в клетках содержится N копий плазмиды. Пусть τ_N – вероятность потери одной копии плазмиды при делении клетки. Это означает, что в класс клеток с i копиями плазмид переходят клетки только из классов с $i+1$ или $i-1$ копиями плазмиды. Тогда для последовательной потери плазмид при делении клеток разнокопийных вариантов в популяции бактерий справедливо уравнение непрерывности

$$\frac{\partial F}{\partial t} + \operatorname{div}(x F) = [\mu(x, S, \varepsilon) - D]F, \quad (1)$$

где F – плотность популяции, $\mu(x, S, \varepsilon)$ – удельная скорость роста популяции; D – удельная скорость разбавления среды в хемостате; ε – эффективности

Институт биофизики Сибирского отделения
Российской Академии наук, Красноярск

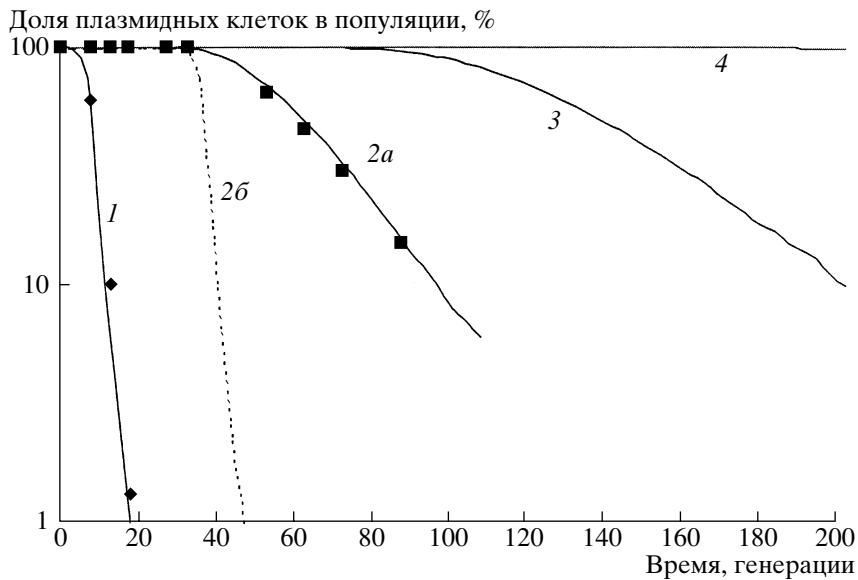


Рис. 1. Снижение селективного преимущества бесплазмидных вариантов многокопийного рекомбинантного штамма при длительном культивировании в неселективных условиях в хемостате. 1 – исход конкуренции бесплазмидного варианта и исходного рекомбинантного штамма при интродукции в начальный момент времени 0.1% бесплазмидных изогенных клеток (точки – экспериментальные данные [2], непрерывная кривая – расчеты по модели (4) при $N = 8$); 2a – замещение исходного штамма бесплазмидным вариантом при длительном культивировании в хемостате (автоселекция) (точки и непрерывная кривая – как в 2a; 2б – расчеты для данных 2a по модели Левина–Стюарта, в которой многокопийность не учитывается; 3 – расчеты по модели (4) при $N = 15$; 4 – то же при $N = 30$). Во всех расчетах полагалось: $\mu(x, S) = (1 - 0.6i/N)S/(1 + S)$, $\tau = 3 \cdot 10^{-2}$, $D = 0.5$ (значения всех коэффициентов приведены в безразмерных единицах).

экспрессии клонированных в плазмиде генов, S – концентрация субстрата, лимитирующего рост микроорганизмов, x – относительная копийность плазмид на клетку (нормированная на максимальную N), \dot{x} – скорость потока плазмид из класса клеток с копийностью x в класс клеток с копийностью $x + dx$.

При условии, что потеря каждой копии плазмиды при делении клеток происходит независимо от других копий, можно положить, что скорость потери плазмид пропорциональна удельной скорости роста популяции и числу копий плазмиды в клетке:

$$\dot{x} = -\tau\mu(x, S, \varepsilon)x, \quad (2)$$

где τ – удельная вероятность потери одной копии плазмиды при делении клетки.

Объединяя (1) и (2), получаем уравнение на динамику плазмид в популяции нестабильного рекомбинантного штамма:

$$\frac{\partial F}{\partial t} = [\mu(x, S, \varepsilon) - D]F + \frac{\partial}{\partial x}[\tau x\mu(x, S, \varepsilon)F], \quad (3)$$

где $\partial/\partial x \equiv \text{div}$.

Дополняя (3) уравнением динамики лимитирующего рост микроорганизмов субстрата S , получим математическую модель популяционной динамики плазмид в хемостате:

$$\begin{aligned} \frac{\partial F}{\partial t} &= [\mu(x, S, \varepsilon) - D]F + \frac{\partial}{\partial x}[\tau x\mu(x, S, \varepsilon)F], \\ \frac{\partial S}{\partial t} &= D(S_0 - S) - \int_0^1 \rho(x) \frac{\mu(x, S, \varepsilon)F(x, t)}{y(x, S)} dx, \end{aligned} \quad (4)$$

где S_0 – концентрация субстрата на входе, $y(x, S)$ – экономичность использования субстрата, $\rho = di/dx$ – плотность состояний.

Анализ экспериментальных данных И. Джонса с соавт. [2] с помощью математической модели (4) показывает, что снижение селективного преимущества бесплазмидных вариантов действительно наблюдается при уменьшении среднего числа копий плазмиды на клетку у многокопийных рекомбинантных штаммов и обязательно должно происходить в хемостате при достаточно большом числе копий плазмид в клетках ($N \sim 10$) (рис. 1).

В наших экспериментах была обнаружена зависимость длительности поддержания плазмидодержащих клеток в хемостате ($D = 0.1 \text{ ч}^{-1}$) от эффективности экспрессии клонированных в плазмиде генов в неселективных условиях (рис. 2). Нестабильный рекомбинантный штамм *E. coli* Z905 содержал плазмиду pPHL-7, в составе которой находились клонированные под контролем *lac*-промотора в векторе pUC18 гены люминесцентной

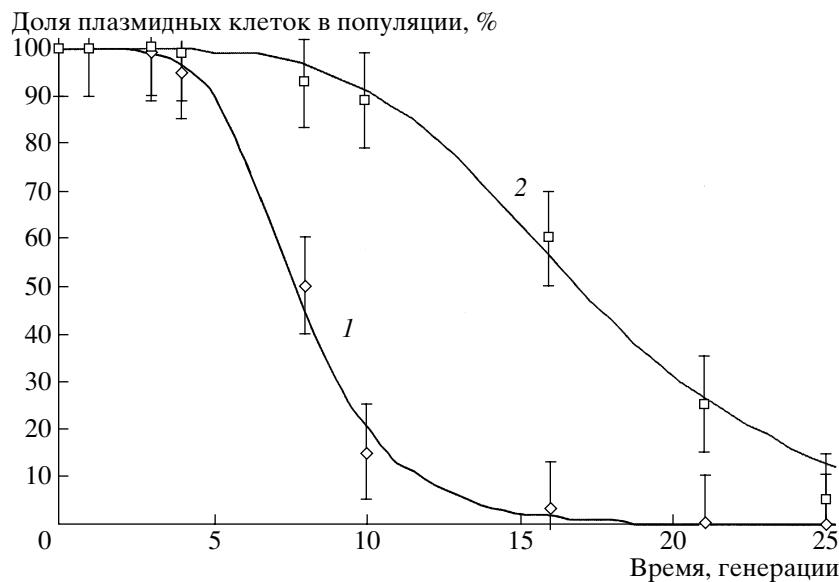


Рис. 2. Динамика структуры популяции *E. coli* Z905 (pPHL-7) в хемостате (точки – экспериментальные данные, непрерывные кривые – расчеты по модели (4)). 1 – при лимитировании роста глицерином, 2 – при лимитировании роста глюкозой (в обоих случаях удельная скорость разбавления среды $D = 0.1 \text{ ч}^{-1}$).

системы морских светящихся бактерий *P. leio-gnathii* [11]. Эффективность экспрессии клонированных *lux*-генов изменялась в зависимости от типа лимитирующего рост субстрата – источника углерода и энергии. Как видно из экспериментальных данных, приведенных на рис. 2, длительность поддержания плазмидных клеток на среде с глюкозой значительно выше, чем на среде с глицерином. Это связано с тем, что при выращивании на среде с глюкозой наблюдается катаболитная репрессия люминесцентного оперона, которая снимается при культивировании на среде с глицерином. На рис. 2 (непрерывные линии) приведены также расчеты по математической модели (4), в которой учтено влияние эффективности экспрессии клонированных генов на удельную скорость роста популяции и вероятность потери плазмиды при делении.

Отличие кинетических характеристик роста популяции штамма, содержащего определенное количество копий плазмид, в сравнении с аналогичными у бесплазмидных или малокопийных вариантов, либо у вариантов, содержащих структурно измененные плазмиды, служит своеобразным “усилителем” нестабильности рекомбинантных штаммов в хемостате, поскольку благодаря ему создается селективное преимущество в скорости размножения вариантов с различным числом копий по сравнению с исходным штаммом. В качестве удобной характеристики нестабильности рекомбинантных штаммов микроорганизмов при интенсивном культивировании можно использовать величину времени полуэлиминации плазмид из популяции (промежуток времени, за который по-

ловина всех копий плазмиды элиминируется из популяции). Из модели (4) непосредственно вытекает следующее утверждение.

Теорема. *Время полуэлиминации бактериальных плазмид в хемостате в стационарном состоянии не зависит от максимального числа копий плазмиды в клетках и равно*

$$T_{1/2} = g/\tau, \quad (5)$$

где $g = \ln 2/D$ – среднее время генерации (время между двумя последовательными делениями), τ – вероятность потери одной копии плазмиды при делении.

Расчеты по математической модели (4), иллюстрирующие это утверждение для разных значений максимального числа копий плазмиды (N) в клетках, приведены на рис. 3. Таким образом, если известна вероятность потери одной копии плазмиды τ и время генерации g , то с помощью выражения (5) можно оценить характерную длительность процессов ферментации до того момента времени, когда продуктивность рекомбинантного штамма снизится из-за потери плазмид с клонированными в них генами примерно вдвое. С этой точки зрения время полуэлиминации (5) может служить важной характеристикой популяционной устойчивости генноинженерных штаммов-продукентов.

В более общем случае для описания популяционной динамики нескольких разных плазмид в клетке необходимо, прежде всего, сформировать вектор плазмид в популяции:

$$x = (x_1, x_2, \dots, x_j), \quad (6)$$

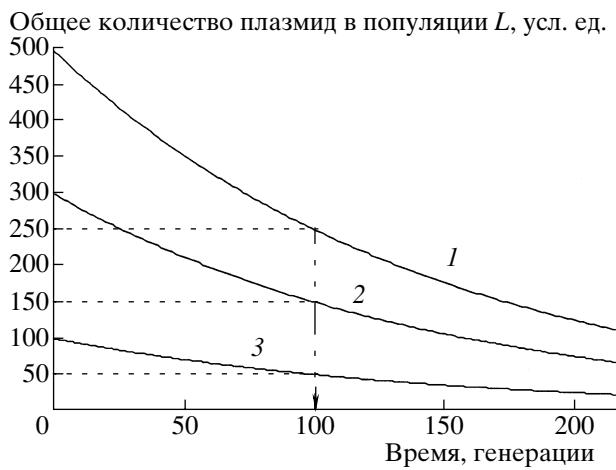


Рис. 3. Снижение полного числа копий плазмиды в популяции в хемостате в неселективных условиях при разном максимальном числе копий в клетке N ($\tau = 10^{-2}$). 1 – $N = 50$, 2 – $N = 30$, 3 – $N = 10$. Стрелкой отмечено время полуэлиминации плазмид.

где x_1 – относительная концентрация плазмид типа 1, x_2 – относительная концентрация плазмид типа 2 и т.д. Затем задаются различные свойства плазмид в виде системы дифференциальных уравнений, описывающих, например, совместимость, сегрегационную, структурную нестабильность плазмид и т.д.:

$$\dot{x} = \frac{dx}{dt} = f(x_1, x_2, \dots, x_j). \quad (7)$$

Подставляя (7) в уравнение непрерывности (1) и дополняя уравнением для лимитирующего рост субстрата S , можно получить математическую модель в случае многоплазмидного многокопийного рекомбинантного штамма:

$$\begin{aligned} \frac{\partial F}{\partial t} &= [\mu(x, S, \varepsilon) - D]F - \text{div}(f)F - (f, \vec{\nabla} F), \\ \frac{dS}{dt} &= D(S_0 - S) - \int_{x_1 \dots x_j} \frac{\mu(x, S, \varepsilon)F}{y(x, S)} dx_1 \dots dx_j. \end{aligned} \quad (8)$$

Подход к моделированию динамики численности биологических популяций, основанный на уравнении непрерывности, использовался ранее рядом исследователей для описания распределения организмов по некоторым признакам, например возрасту или размерам [12–15]. Развитый в

настоящей работе подход позволяет описывать популяционную динамику плазмид многокопийных многоплазмидных штаммов микроорганизмов, в том числе с учетом различной эффективности экспрессии клонированных генов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 97-04-499).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вельков В.В. // Генетика. 1983. Т.19. № 10. С. 1575–1581.
2. Jones I.M., Primrose S.B., Robinson A., Ellwood D.C. // Mol. and Genet. 1980. V. 180. P. 570–584.
3. Wouters J.T.M., Driehuis F.L., Polaczek P.J. et al. // Antonie van Leeuwenhoek. 1980. V. 46. № 4. P. 353–362.
4. Боронин А.М., Денисов Г.А., Лазарев П.И. Математические модели динамики численностей бактериальных плазмид. Препр. ОНТИ НЦБИ АН СССР. Пущино, 1983. 43 с.
5. Levin B.R., Stewart F.M. // Genetics. 1980. V. 94. № 1. P. 425–443.
6. Levin B.R., Stewart F.M. // Ibid. 1977. V. 87. № 10. P. 209–228.
7. Апонин Ю.М., Апонина Е.А. В кн.: Исследования по математической биологии. Сб. научных трудов, посв. памяти А.Д. Базыкина. Пущино: Изд-во Пущинского научн. центра РАН, 1996. С. 32–48.
8. Печуркин Н.С., Брильков А.В., Марченкова Т.В. Популяционные аспекты биотехнологии. Новосибирск: Наука, 1990. С. 1–172.
9. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. М.: Высш. шк., 1988. 208 с.
10. Thomas C.M., Wellington E.M.H., Diaz-Orejas R., Espinosa M. // Microbiology. 1994. V. 140. Pt 8. P. 1799–1801.
11. Илларионов Б.А., Протопопова М.В. Клонирование и экспрессия генов люминесцентной системы *Photobacterium leiognathi* в плазмидном векторе pUC-18. Препр. Ин-та физики им. Л.В. Киренского СО АН СССР. Красноярск, 1986.
12. Динамическая теория биологических популяций / Под ред. Р.А. Полуэтрова. М.: Наука, 1974. 455 с.
13. Свиридов Ю.М. В сб.: Математическая биология и медицина. М.: Наука, 1978. Т.1. С. 117–165.
14. Степанова Н.В. В сб.: Математические модели в экологии. Горький: Изд-во ГГУ, 1980. С. 95–113.
15. Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. Математическое моделирование в биофизике. М.: Наука, 1975. 344 с.